

UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Campomanesia aurea* FRENTE A BACTÉRIAS
CAUSADORAS DE DOENÇAS ALIMENTARES**

Daniel Kuhn

Lajeado, dezembro de 2018

Daniel Kuhn

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Campomanesia aurea* FRENTE A BACTÉRIAS
CAUSADORAS DE DOENÇAS ALIMENTARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia Agroalimentar.

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Hoehne

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo M. Ethur

Lajeado, dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dra. Lucélia Hoehne, por todos os ensinamentos transmitidos, pela confiança depositada, disposição e incentivo. Agradecimento também por todo conhecimento transmitido em sala de aula.

Ao meu coorientador, professor Dr. Eduardo Miranda Ethur, por ter concedido confiança para poder participar da sua linha de pesquisa e pelo conhecimento transmitido, desde a época de graduação.

Ao grupo de pesquisa “Estudo etnobotânico, químico e atividade biológica de plantas brasileiras”, em especial para Bárbara Buhl, Talita Scheibel, Leandra Andressa Pacheco e Luisa Capra, que me auxiliaram e instruíram muito durante os procedimentos analíticos.

A todos os meus colegas do grupo de pesquisa “Detecção e remoção de micropoluentes emergentes em sistemas de captação de águas superficiais e efluentes”, que de alguma forma colaboraram com esse trabalho, e especialmente pela amizade.

A professora Dra. Carla Kauffmann e professora Dra. Daiane Heidrich, que em algum momento foram uma luz para um químico no mundo da microbiologia.

Aos meus pais, Serena e Celso, e minha irmã Juliane, que por mais dificuldade que possamos ter passado por esse período, demonstraram o verdadeiro significado da palavra família.

Aos meus amigos, por todo o apoio.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código Financeiro 001) por me oferecer a bolsa de estudo, e poder concretizar mais essa etapa.

RESUMO

Campomanesia aurea é uma planta nativa do bioma Pampa, pertencente à família Myrtaceae. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial de *Campomanesia aurea* (EOCA) contra *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Uma análise da composição química do EOCA foi realizada através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). A análise para avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antibiofilme foi realizada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e do antibiofilme através da utilização de placas de 96 poços com auxílio de cristal violeta. A ação do padrão (*E*)-Nerolidol (composto majoritário da EOCA) também foi testada. A análise por CG-EM revelou a presença do sesquiterpeno (*E*)-Nerolidol (56,04%) como principal composto no EOCA. Atividade antimicrobiana do EOCA contra *L. monocytogenes* (CIM 5,0 mg.mL⁻¹) e *S. aureus* (CIM 0,7 mg.mL⁻¹) foi observada. Inibição da formação de biofilme contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. Enteritidis* pôde ser observada para EOCA e (*E*)-Nerolidol. Os resultados demonstram que o óleo essencial de *Campomanesia aurea* e o padrão de (*E*)-Nerolidol foram eficientes contra a inibição da formação de biofilme para a maioria dos patógenos testados.

Palavras-chave: Biofilme. Óleo essencial. Microrganismos patogênicos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estágios do desenvolvimento dos biofilmes.....	16
Figura 2 – Imagens (A, B e C) de microscopia eletrônica de varredura, demonstrando o processo de adesão e formação de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853. A, B e C representam os tempos de incubação de 6, 24 e 48 horas, a 37 °C.....	17
Figura 3 – Divisão dos biomas na região sul do Brasil.....	19
Figura 4 - Imagem da espécie <i>Campomanesia aurea</i> , família Myrtaceae, nativa do Rio Grande do Sul.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial de <i>Campomanesia aurea</i> (EOCA).....	31
Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do EOCA e (<i>E</i>)-Nerolidol sobre <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853, (n=3).....	34
Tabela 3 – Inibição da formação de biofilme (%) de EOCA e (<i>E</i>)-Nerolidol sobre <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)	11
3.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	12
3.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.1.3	<i>Salmonella Enteritidis</i>	14
3.1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
3.2	Biofilmes	15
3.3	Óleos essenciais	17
3.4	Bioma Pampa	18
3.4.1	<i>Campomanesia aurea</i>	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Artigo Científico	22
5	CONCLUSÃO	47

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da produção de alimentos industrializados, a incidência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) também vem crescendo nos últimos anos (GERMANO; GERMANO, 2011; TONDO; BARTZ, 2011). Conforme a Vigilância Sanitária (VISA), classificam-se como DTAs todas as ocorrências clínicas consequentes à ingestão de alimentos que possam estar contaminados com microrganismos patogênicos, toxinas de microrganismos, substâncias químicas, objetos lesivos ou que contenham, em sua constituição, estruturas naturalmente tóxicas. São doenças consequentes da ingestão de perigos biológicos, químicos ou físicos presentes nos alimentos (BRASIL, 2010).

As DTAs são responsáveis por milhares de hospitalizações, centenas de mortes e, muitas vezes, complicações irreversíveis. Essas infecções normalmente ocorrem após um curto período de incubação, provocando náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal e presença ou ausência de febre. Os infectados podem apresentar melhora no quadro clínico em um curto período de tempo, porém, pessoas imunocomprometidas (idosos, crianças, doentes) podem ter complicações graves, podendo resultar em morte (GERMANO; GERMANO, 2011).

Na Europa, América do Norte e América Latina, alguns estudos epidemiológicos desenvolvidos identificaram os principais agentes etiológicos de toxinfecções alimentares, entre eles *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* (GERMANO; GERMANO, 2011), sendo que cerca de 45% das intoxicações alimentares de origem bacteriana estão relacionadas a *Staphylococcus aureus* (FRANCO; LANDGRAF, 1996). *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* também são conhecidas por causar doenças relacionadas ao consumo de

alimentos contaminados (HOSSAIN, Z.; 2014; KUMARASWAMY et al., 2018).

A diversidade metabólica e a capacidade de adaptação a estresses ambientais são características fundamentais dos microrganismos. As bactérias existem em dois estados de vida básicos, sendo como células planctônicas (também conhecidas como células de vida livre) ou como células sésseis (também conhecidas como biofilmes). Costerton, Stewart e Greenberg (1999) destacaram a importância de estudos sobre biofilmes bacterianos, salientando que a formação destes e a sua inerente resistência aos antimicrobianos constituem a causa de muitas infecções crônicas. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Enteritidis* e *Listeria monocytogenes* são microrganismos formadores de biofilmes (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010; STEENACKERS et al., 2012; HEIR et al., 2018).

Pesquisas são desenvolvidas em busca de alternativas para o tratamento e/ou prevenção destas infecções, devido à grande relevância e prejuízos causados por esses microrganismos, podendo fornecer, deste modo, meios às indústrias alimentícias e à população alternativas para evitar a contaminação dos alimentos que são ingeridos. A atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos vegetais frente aos mais variados microrganismos vem sendo investigada ao longo dos anos, e surge como um importante recurso (AKTHAR; DEGAGA; AZAM, 2014; DUSCHATZKY et al., 2005; HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; LANG; BUCHBAUER, 2012). Óleos essenciais são componentes voláteis complexos, sintetizados naturalmente em diferentes partes da planta durante o processo do metabolismo secundário, tendo um grande potencial no campo da biotecnologia e biomedicina, pois atuam efetivamente contra várias bactérias, fungos e patógenos virais (SWAMY; AKHTAR; SINIAH, 2016).

Muitos locais onde há uma vasta diversidade de plantas ainda não foram avaliadas quanto ao seu potencial biológico. Entre esses locais, destaca-se o bioma Pampa brasileiro, que faz parte da área do Pampa maior que cobre metade sul do estado brasileiro do Rio Grande do Sul, Uruguai e províncias no norte e noroeste da Argentina. A *Campomanesia aurea* é uma espécie nativa do bioma Pampa conhecida popularmente como “guabirobinha-do-campo” ou “araçá-rasteiro”, e pertence à família Myrtaceae. Estudos têm demonstrado o potencial biológico de espécies da família Myrtaceae (NAKAMURA et al., 2010; NERINUMA et al., 2013; SERAGLIO et al., 2018; DA SILVA et al., 2018), mas até o momento não há relatos na literatura com a espécie *Campomanesia aurea* para avaliar a atividade

antimicrobiana de seu óleo essencial.

Diante do exposto, a busca por alternativas que visam minimizar ou eliminar o risco da ocorrência de infecção por estes microrganismos, através da aplicação de produtos antimicrobianos advindos de plantas, são de grande relevância. Deste modo, o presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Campomanesia aurea* e de seu componente majoritário, o (*E*)-Nerolidol, contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*, através da determinação da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima, pelo método de micro diluição em caldo, e determinação da atividade antibiofilme.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Campomanesia aurea* frente aos microrganismos *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o óleo essencial por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial e do componente majoritário encontrado no óleo essencial, frente aos microrganismos supracitados na sua forma planctônica.
- Verificar a capacidade de inibição da formação de biofilme dos microrganismos supracitados com a utilização do óleo essencial e de seu componente majoritário.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são o resultado da ingestão de alimentos contaminados com um microrganismo, toxina ou produto químico que é introduzido na cadeia de produção de alimentos. A maioria das DTAs é devida a agentes infecciosos, onde a contaminação pode surgir do ambiente em que animais ou plantas são cultivados e colhidos, do processamento ou transporte, dos estágios finais da preparação de alimentos na cozinha ou das mãos que manipulam o alimento. Essas doenças podem acometer uma única pessoa, ou podem causar surtos, com potencial de atingir centenas ou milhares de pessoas (SEVENTER; HAMER, 2017). Patógenos podem ocasionar diversos tipos de DTAs, entre elas destaca-se: a) infecção transmitida por alimentos, quando um alimento contaminado com o patógeno é consumido; b) intoxicação por alimentos, através de toxinas produzidas pelos patógenos no alimento consumido e c) doenças causadas por toxinas transmitidas por alimentos, que são causadas por toxinas produzidas no organismo após o alimento ser ingerido (NELLURI; THOTA, 2018). As DTAs, além de causarem morbidade e mortalidade em todo o mundo, também são uma barreira significativa para o desenvolvimento socioeconômico (NEWELL et al., 2010). O Comitê de Segurança Alimentar (FAO/OMS) avaliou a contaminação por microrganismos em alimentos como um problema generalizado de saúde mundial (KÄFERSTEIN et al, 1997).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde demonstram que, no período entre o ano de 2000 e 2016, foram registrados mais de 12.000 casos de surtos provocados por DTAs, e 174

óbitos decorrentes desses surtos (BRASIL, 2018). Entre os principais causadores desses surtos, estão *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. Os dados sobre DTAs, principalmente em países em desenvolvimento, podem ser incompletos, uma vez que casos esporádicos ou surtos podem não ser relatados e, portanto, não diagnosticados e não investigados (HAVELAAR et al., 2015).

3.1.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* compreende bactéria Gram-positivas, anaeróbica facultativa, não formadores de esporos, com medidas de 0,4 – 0,5 µm de diâmetro e 0,5 – 2,0 µm de comprimento. Sua temperatura de crescimento é de -4 a 45 ° C e tolera uma ampla faixa de pH (4,4 – 9,4), assim como concentrações de cloreto de sódio (10%) (ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013). Neste gênero, destaca-se a *Listeria monocytogenes*, um enteropatógeno aeróbio e anaeróbio facultativo, que possui diversos mecanismos adaptativos para sobreviver e desenvolver-se em condições ambientais adversas ou extremas, pois é termo resistente, osmotolerante, tolerante a pH ácido e resistente a antimicrobianos e desinfetantes (JAY, 2005; LARRAIN; CARVAJAL, 2008; ALEJANDRA et al., 2013). A *Listeria monocytogenes* é conhecida como um patógeno que causa sérios malefícios à saúde da população, quando ingeridos alimentos contaminados, podendo levar a um estado patológico denominado de listeriose. Este estado patológico pode provocar sintomas similares aos da gripe, como dores fortes de cabeça, febre, vômitos e náuseas e ainda causar complicações crônicas como: meningite, encefalite, septicemia, osteomielite, endocardite, abortos, natimortos e até mesmo a morte. A taxa de mortalidade da listeriose é de 70% nos casos de meningite, 50% nos casos de septicemia e acima de 80% em infecções perinatais-neonatais (MANTILLA et al., 2007; FORSYTHE, 2013).

Este patógeno pode ser encontrado em diversos alimentos crus ou processados, pois encontra-se presente principalmente em equipamentos e materiais de processo produtivo. A falha de higienização propicia a aderência deste microrganismo e, conseqüentemente, a sua multiplicação (ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013). Logo, a contaminação por *Listeria monocytogenes* pode causar muitos prejuízos e, por isso, o estudo para desenvolver novas alternativas eficientes para inibi-la vem se tornando de extrema importância no meio científico (SILVA et al., 2010).

3.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus identifica um gênero de bactérias Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, mesófilas, com tamanho aproximado de 0,5 a 1,0 µm e com temperatura ótima de crescimento em torno de 30 a 37 °C (WILLIAMS; WILKINS, 1994). Portanto, este gênero é sensível a altas temperaturas, desinfetantes e soluções antissépticas, porém pode sobreviver em superfícies secas durante longos períodos de tempo. Neste gênero, a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais comum, e também a mais virulenta (MURRAY, 2009). Habita frequentemente a mucosa nasal, a partir das quais contamina as mãos e, então, pode facilmente penetrar no alimento. Além da importância da manipulação e saúde do manipulador de alimento, também é importante observar outras fontes de contaminação deste microrganismo, como qualidade da matéria-prima alimentar, as condições do ambiente de trabalho, as características do equipamento e dos utensílios e as condições técnicas do material de limpeza (TORTORA; FUNKE; CASE; 2000). Em apenas um curto período de incubação (1 a 6 horas) após a ingestão do alimento é possível observar os sintomas dessas intoxicações, que são caracterizadas por náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia (PASSOS; KUAYE, 1996).

S. aureus possui mecanismos e estratégias para escapar do sistema imunológico humano, como uma série de proteínas de superfície, enzimas segregadas e toxinas que danificam a membrana por ação citolítica. Sendo assim, ele pode causar de uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até infecções mais graves como meningite, pericardite, bacteremia e síndrome do choque tóxico (SANTOS, 2007). A causadora da intoxicação alimentar deste microrganismo é a sua exotoxina (enterotoxina), produzidas pela bactéria, e por sua vez termoestável, podendo assim permanecer no alimento mesmo após o cozimento. A preocupação com este microrganismo é grande, pois cerca de 45% das intoxicações alimentares de origem bacteriana, estão relacionadas a ele (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

3.1.3 *Salmonella Enteritidis*

Salmonella spp. são bactérias Gram-negativas, bacilos móveis, dotados de flagelos, são aeróbias ou anaeróbias facultativas e não formam esporos. Sua temperatura de crescimento pode variar de 7 a 48°C, sendo a temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C. Produzem gás a partir de glicose e são capazes de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono (ANDRADE, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). *Salmonella* spp. é amplamente distribuída na natureza, sendo o trato intestinal do homem e de animais o principal reservatório natural. As aves têm papel especialmente importante, pois podem ser portadores assintomáticos, excretando continuamente o microrganismo pelas fezes, podendo causar contaminações cruzadas de grande importância industrial (GERMANO; GERMANO, 2001).

A principal doença ocasionada pela *Salmonella* spp. é a salmonelose, apresentando como sintomas mais comuns vômito, diarreia, febre, náuseas e dores abdominais. Os sintomas da contaminação por este patógeno, na maioria dos casos, surgem entre 12 e 36 horas, após a ingestão do alimento contaminado (LÖFSTRÖM et al., 2016). Uma ampla variedade de alimentos contaminados é associada à salmonelose, incluindo carne bovina crua, aves domésticas, ovos, leite e derivados, peixes, tempero para saladas, mistura para bolos, cacau, manteiga de amendoim, cascas de ovos e gemas (ANDRADE, 2008). Dos casos de salmonelose, *Salmonella Enteritidis* é a responsável por um grande número de casos ao redor do mundo, representando 58% dos casos na Europa, 38% na Ásia e 31% na América Latina e no Caribe (GALANIS et al., 2006). O primeiro surto relatado de salmonelose transmitida por alimentos foi relacionado a *Salmonella Enteritidis*, pelo consumo de carne bovina contaminada (REY; SILVESTRE, 2009).

3.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas spp. são bactérias Gram-negativas, na forma de bastonetes reto ou ligeiramente curvo de 0,5 a 0,8 µm de largura por 1,5 a 3,0 µm de comprimento, aeróbio estrito, não-esporulado, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (POLLACK, 1995). Neste gênero, a espécie *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno humano que está frequentemente associado a infecções hospitalares, principalmente em pacientes

imunossuprimidos (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000), podendo causar desde infecções superficiais da pele à sepse fulminante, devido à produção de toxinas e infecção crônica pela ação da camada espessa que consiste no seu biofilme, e ainda, pode resultar no somatório dos tipos de infecção pela ação concomitante desses componentes (MURRAY, 1995; PALLERONI, 1998). Estas infecções estão associadas ao contato com água ou soluções contaminadas, assim como também pode ser encontrado no sistema respiratório de pacientes com fibrose cística, entre outras doenças genéticas pulmonares (KNOWLES et al. 1995; BARTH; PITT, 1998), além de infecções hospitalares como pneumonia, trato respiratório e infecção no sangue (NEVES et al., 2014). Logo, por ter preferência por locais úmidos, este microrganismo é encontrado frequentemente em áreas do corpo humano como orofaringe, axilas, períneo e mucosa nasal, sendo o trato gastrointestinal sua principal área de colonização (POLLACK, 2000). Pode ser isolada de água, plantas, solo e tecidos animais e tem habilidade de utilizar vários substratos orgânicos como fontes de carboidrato. Sua presença na água do solo contribui para que chegue aos vegetais e até ao intestino humano.

3.2 Biofilmes

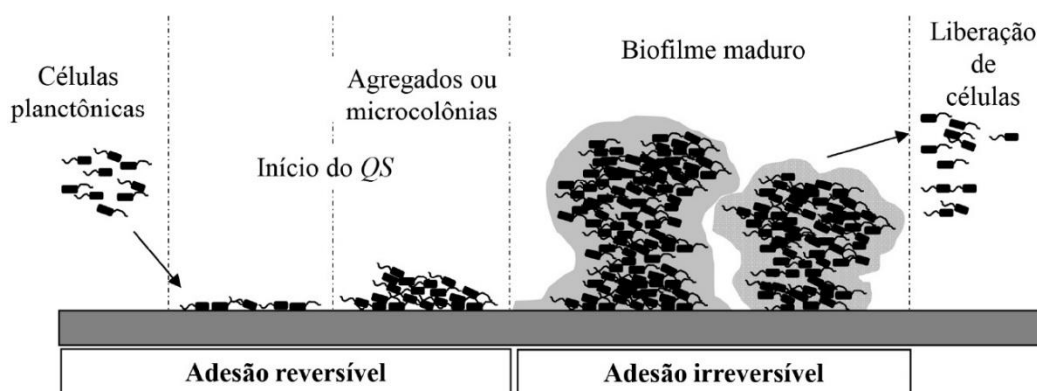
A capacidade de adaptação a estresses ambientais e a diversidade metabólica são características fundamentais dos microrganismos. As bactérias podem se apresentar em dois estados de vida básicos, sendo eles como células planctônicas ou como células sésseis, conhecidas também como biofilmes. Células planctônicas são importantes para a rápida proliferação e propagação do microrganismo, enquanto que as células sésseis podem caracterizar a cronicidade. Após a promulgação da teoria geral da existência de biofilmes em 1978 (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978), estudos têm revelado que a maioria das bactérias não cresce como células individuais, mas em comunidades como biofilmes, estando presente em praticamente todos os ecossistemas naturais e patogênicos (COSTERTON et al., 1987; LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

A adesão bacteriana pode ocorrer tanto em uma superfície abiótica (como em plásticos e metais, por exemplo) quanto em superfícies bióticas (como em tecidos animais e vegetais). A primeira etapa para a formação do biofilme é mediada por interações físicas e químicas não específicas (superfícies abióticas), como movimento browniano e da força gravitacional, ou acompanhada por interações moleculares mediadas por ligações do tipo receptor-ligante

(DUNNE, 2002). Conforme a densidade bacteriana aumenta na superfície, um processo de comunicação encontrado em muitas bactérias patogênicas tem início. Esse processo é referido como *Quorum sensing* (QS). Esse processo de comunicação acopla a transcrição de genes específicos que regulam várias funções, como motilidade, virulência, produção de matriz exopolissacarídica (EPS) e a formação de biofilmes. Os estágios de formação do biofilme podem ser observados na Figura 1.

A segunda etapa, também chamada de adesão secundária ou irreversível, consolida o processo de adesão de microrganismos fracamente ligados à superfície através da produção de EPS, sendo capazes inclusive de se ligar a células de diferentes espécies (STOODLEY et al., 2002). EPS representa uma fração variável de 65-95% do total do volume do biofilme, sendo o restante do volume bactérias (POZO; PATEL, 2007). Em determinadas situações, o desprendimento de células planctônicas ou de grupos de células unidas pelo EPS pode ocorrer, a fim de colonizar novo local. Isso ocorre devido à programação celular para a virulência, ou condições não favoráveis no ambiente (BAYLES, 2007).

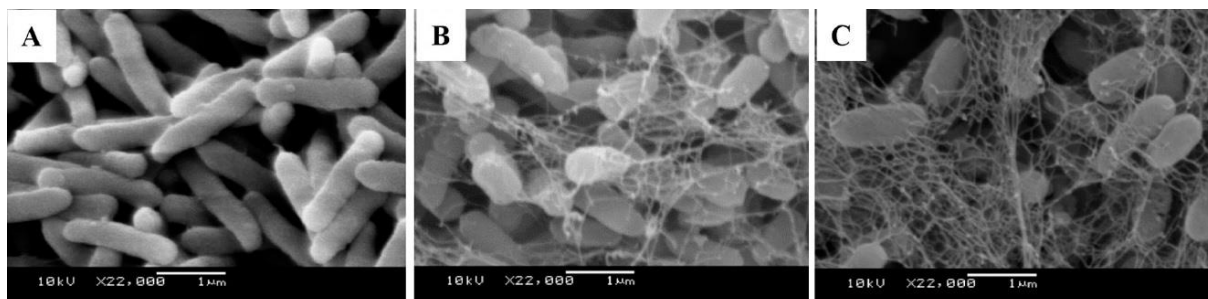
Figura 1 – Estágios do desenvolvimento dos biofilmes.



Fonte: Trentin, Giordani e Macedo (2013).

Na Figura 2 pode-se observar o processo de adesão e formação de biofilme para *Pseudomonas aeruginosa*. Uma das mais importantes características dos biofilmes bacterianos é a sua resistência aos agentes antimicrobianos, que são frequentemente de 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos. Isso pode ocorrer em parte por alguns fatores, como a baixa penetração de agentes químicos (devido ao EPS), crescimento lento de células no interior do biofilme ou ainda transferência de genes de resistência (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Figura 2 - Imagens (A, B e C) de microscopia eletrônica de varredura, demonstrando o processo de adesão e formação de biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 27853. A, B e C representam os tempos de incubação de 6, 24 e 48 horas, respectivamente, a 37°C.



Fonte: Trentin, Giordani e Macedo (2013).

Nesse contexto, Neidell et al. (2012) afirmam que infecções causadas por agentes etiológicos resistentes aos antimicrobianos são um grande desafio para saúde pública atual, podendo acarretar na elevação das taxas de mortalidade, aumento no tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde.

3.3 Óleos essenciais

Óleos essenciais são componentes voláteis complexos, sintetizados naturalmente em diferentes partes da planta durante o processo do metabolismo secundário. De uma forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas e geralmente odoríferas e líquidas. Apresentam também como características aparência oleosa à temperatura ambiente, solubilidade em solventes orgânicos apolares, incolores ou ligeiramente amarelados e são geralmente estáveis. Possuem um grande potencial no campo da biotecnologia e biomedicina, pois atuam efetivamente contra várias bactérias, fungos e patógenos virais. A reatividade do óleo essencial dependerá da natureza, composição e orientação de seus grupos funcionais (SWAMY; AKHTAR; SINIAH, 2016).

Algumas plantas são conhecidas como produtoras de óleo essencial, especialmente plantas superiores, angiospermas e gimnospermas (SAVIUC et al., 2015). Os óleos essenciais podem estar estocados nas cascas dos caules, raízes, rizomas, frutos, sementes e ainda nas folhas, sendo que sua composição pode variar conforme a localização na planta. Além disso, a composição química dos óleos essenciais pode variar conforme as condições ambientais,

como a estação do ano e composição do solo, por exemplo (DHIFI et al., 2016).

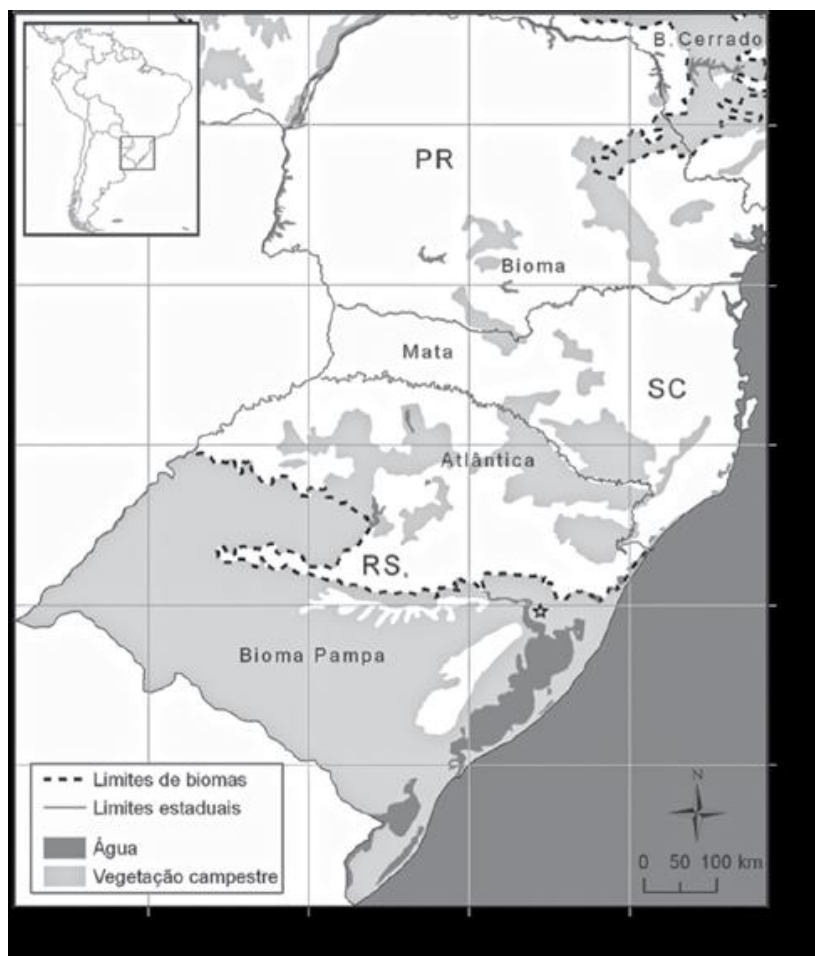
Existem várias vantagens em se usar óleos essenciais contra patógenos, uma vez que são facilmente extraídos, biodegradáveis e facilmente catabolizados no ambiente, não sendo persistentes no solo e na água, com baixa ou nenhuma toxicidade contra vertebrados e ainda desempenham uma importante função na proteção de plantas frente a pestes. Essas propriedades dos óleos essenciais permitem seu uso em áreas sensíveis, como escolas, restaurantes, hospitais e residências (BATISH et al., 2008; BURT, 2004).

3.4 Bioma Pampa

O bioma Pampa brasileiro faz parte da área do Pampa maior que cobre metade sul do estado brasileiro do Rio Grande do Sul (Figura 3), Uruguai e províncias no norte e noroeste da Argentina. O bioma Pampa abrange campos da metade sul e oeste do Rio Grande do Sul, com a paisagem dominada pela vegetação campestre (OVERBECK et al., 2015). Os campos do bioma Pampa apresentam várias fisionomias, com diferentes composições florísticas, que são influenciadas por características geomorfológicas, climáticas e também relacionadas ao manejo e uso do solo. O bioma Pampa é conhecido por sua grande variedade de espécies. Existem mais de 2.150 gimnospermas e angiospermas e pelo menos 250 espécies distribuídas em 54 famílias que já foram identificadas como potencialmente ornamentais para arte floral e paisagismo (BOLDRINI; OVERBECK; TREVISAN, 2015). Contudo, um estudo realizado por Esteves et al., (2017) analisou as mudanças no uso das terras agrícolas no bioma Pampa brasileiro, destacando que a persistência dos campos de gramíneas do Pampa pode estar ameaçada, já que essas áreas estão sendo substituídas por atividades agrícolas mais rentáveis.

Os campos naturais estão enfrentando pressões contraditórias nos países em desenvolvimento. A demanda por produção de alimentos com ganhos em curto prazo e a preocupação pela preservação desses ambientes são pontos cruciais dessa discussão. Coordenar esforços entre políticas produtivas e orientadas para a conservação dos biomas se faz necessário (CARVALHO; BATELLO, 2009).

Figura 3 - Divisão dos biomas na região sul do Brasil.



Fonte: Overbeck et al., (2015).

3.4.1 *Campomanesia aurea*

A *Campomanesia aurea* (Figura 4) é uma espécie nativa do bioma Pampa, popularmente conhecida como “guabirobinha-do-campo” ou “araçá-rasteiro” (LORENZI et al., 2006) e é uma das 36 espécies conhecidas de *Campomanesia* (GOVAERTS et al., 2008), distribuídos pela América Latina (LANDRUM, 1982). Essa planta faz parte da família Myrtaceae, que é constituída por aproximadamente 100 gêneros e 5762 espécies, entre árvores e arbustos, predominantemente em regiões tropicais e subtropicais, distribuídos por todos os continentes (GOVAERTS et al., 2008). No Brasil, a família Myrtaceae representa uma das maiores famílias da flora brasileira, com 23 gêneros e aproximadamente 1000 espécies (LORENZI; SOUZA, 2005). O uso de algumas espécies da família Myrtaceae na

indústria lhe confere importância econômica, como o eucalipto (*Eucalyptus* spp.) que é empregado na produção de papel e indústria madeireira, além de seu óleo ser utilizado na indústria farmacêutica e cosmética. A pimenta da jamaica (*Pimenta dioica*) e o cravo (*Syzygium aromaticum*) são exemplos de espécies utilizadas na indústria de especiarias. A indústria de perfumaria também utiliza espécies da família Myrtaceae, e há ainda espécies que são fonte de frutos, com destaque para a goiabeira (*Psidium guajava*) (GOVAERTS et al., 2008; LORENZI; MATOS, 2002). Além disso, muitas espécies de Myrtaceae são utilizadas como plantas medicinais para tratar diferentes desordens, como inflamações, problemas intestinais, pressão alta e diabetes, entre outros (LEITE-LEGATTI et al., 2012; MALTA et al., 2012; REYNERTSON et al., 2008).

Figura 4 – Imagem da espécie *Campomanesia aurea*, família Myrtaceae, nativa do Rio Grande do Sul.



Fonte: Flora Digital do Rio Grande do Sul, texto digital – Fotógrafo Márcio Verdi

A Família Myrtaceae apresenta espécies produtoras de óleos essenciais. Espécies como *Eugenia uniflora* (L.), *Plinia cauliflora* (Mart.) e *Syzygium cumini* (L.) do bioma Cerrado tiveram seus óleos essenciais extraídos e sua atividade leishmanicida foi testada (DA SILVA et al., 2018), bem como de *Eugenia pitanga*, do bioma Pampa (KAUFFMANN et al., 2017). Óleo essencial das folhas de *Eugenia acutata*, *Eugenia candolleana*, *Eugenia copacabanensis* and *Myrcia splendens* obtidos na Mata Atlântica, no sudeste do Brasil, foram extraídos e caracterizados, a fim de obter dados para uma compreensão adicional das relações filogenéticas entre gênero e espécies da família Myrtaceae (NAKAMURA et al., 2010). Farag et al. (2018) extraíram óleo essencial de folhas de 14 espécies diferentes da família Myrtaceae e avaliaram sua composição, observando a presença de α -pineno, β -pineno, limoneno e 1-8-

cineol, entre outros. Até o momento, a *Campomanesia aurea* é citada como de potencial ornamental (EMER; SCHAFER; FIOR, 2018), e não há relatos na literatura de pesquisas que envolvem a aplicação de seu óleo essencial.

Contudo, extratos vegetais de outras espécies do gênero *Campomanesia* já foram estudadas, como, por exemplo, a *Campomanesia adamantium* (SÁ et al.; 2018), *Campomanesia xanthocarpa* (CZAIKOSKI et al., 2015) e *Campomanesia eugenioides* (MOURA-COSTA et al., 2012), apresentando efeito antimicrobiano.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de artigo científico (Antibiofilm activity of the essential oil of *Campomanesia aurea* against microorganisms causing food borne diseases). Este artigo foi enviado para publicação na revista *LWT – Food Science and Technology*.

4.1 Artigo Científico

Antibiofilm activity of the essential oil of *Campomanesia aurea* against microorganisms
causing food borne diseases

Authors

Daniel Kuhn^{ab}, danielkuhn@universo.univates.br

Rafaela Ziem^a, rafaela.ziem@universo.univates.br

Talita Scheibel^a, talita.scheibel@univates.br

Bárbara Buhl^a, barbara.buhl@universo.univates.br

Daiane Heidrich^{ab}, daiane.heidrich@univates.br

Carla Kauffmann^a, carlakauffmann@univates.br

Elisete M. de Freitas^{ab}, elicauf@univates.br

Eduardo M. Ethur^{ab}, eduardome@univates.br

Lucélia Hoehne^{ab}, luceliah@univates.br*

^a – University of Taquari Valley - Univates, Avenida Avelino Tallini, 171, CEP 95914-014, Lajeado, RS, Brazil.

^b - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec, University of Taquari Valley - Univates, Avenida Avelino Tallini, 171, CEP 95914-014, Lajeado, RS, Brazil.

*Corresponding author

Lucélia Hoehne

University of Taquari Valley

Rua Avelino Talini, 171 – Bairro Universitário, Lajeado/RS – Brasil CEP 95914-014

Tel: (+55)

Abstract

Campomanesia aurea is a native plant of the biome *Pampa*, which belongs to the family Myrtaceae. The present study aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil of *Campomanesia aurea* (EOCA) against *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. An analysis of the chemical composition of the EOCA was realized through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

The analysis for *in vitro* evaluation of the antimicrobial and antibiofilm activity was realized by determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and that of the antibiofilm through utilization of 96-well plates with the help of crystal violet, respectively. The action of standard (*E*)-Nerolidol (major compound of the EOCA) was also tested. GC-MS analysis revealed the presence of the sesquiterpene (*E*)-Nerolidol (56.04%) as the main compound in the EOCA. Antimicrobial activity of the EOCA against *L. monocytogenes* (MIC 5.0 mg/mL) and *S. aureus* (MIC 0.7mg/mL) was observed. Inhibition of biofilm formation against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. Enteritidis* could be observed for EOCA and (*E*)-Nerolidol. The results demonstrate that the essential oil of *Campomanesia aurea* was efficient against inhibition of biofilm formation for most of the tested pathogens.

Key words: Biofilm, essential oil, pathogenic microorganisms.

1 Introduction

Food borne diseases (FBDs) are caused by ingestion of decayed food, contaminated by microorganisms, mainly harmful bacteria. Other bacteria, molds, viruses or parasites, beside natural toxins, chemical substances and physical agents can also provoke these diseases (SCALLAN et al., 2011). In some cases, these diseases can become a serious danger for life, principally for children living in developing countries, followed by chronic sequels and disabilities. Their symptoms can vary from light to severe, including abdominal colic, nausea, vomit, dehydration, diarrhea and fever (SHARIF; JAVED; NASIR, 2018). There are different contamination sources, as the soil, manipulation techniques, preparation of food, or preservation conditions of food storage. Food borne diseases probably are a more frequent problem related to health, since pathogenic microorganisms possess the capacity to support

various immunologic answers of the host (KUMAR et al., 2017).

Bacterial contamination of food contact surfaces is an important factor for persistence of pathogens in food processing environments. Bacteria, causing FBDs can form spatially organized vibrant ecosystems within the food matrix, called biofilms, which may be the precursors of drug resistance and present challenges for infection control (BRIDIER et al., 2015; FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). Prevention of biofilm formation and growth are essential to impede biological fouling and treatment of related infection (ZHANG et al., 2018). The control of biofilm formation can be done through a variety of applications, as for example, avoidance of fouling in production systems (XIONG; LIU, 2010) or as alternative or coadjuvant therapy against bacterial infections (BRACKMAN et al., 2009).

Many chemical disinfectants utilized in sanitation, as chlorine compounds, may imply particular risk to humans, because their reaction with organic matter produce toxic sub products, besides being corrosive to industrial equipments (FUKUZAKI, 2006; MEIRELES; GIAOURIS; SIMÕES, 2016). Thus, the search for alternatives for treatment and/or prevention of infections, also for those related to biofilms, is a highly topical issue, thus numerous studies are developed to tackle this challenge. Other alternatives, which encompass this aspect, were also applicated, as effect of bacterial antagonism (IBARRA-SÁNCHEZ; VAN TASSELL; MILLER, 2018), antimicrobial coating (HUANG et al., 2017), or cold plasma (COUTINHO et al., 2018). However, some disinfection techniques are not cost-friendly or require special technical capacitation. The antimicrobial activity of essential oils (EOs) and plant extracts against the most varied microorganisms has been investigated over the last years. EO came up as an important alternative, demonstrating great potential due to effective action against various bacterial pathogens, molds and viroses (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017; DA SILVA GÜNDEL et al., 2018; FARISA BANU et al.,

2018; MANGANYI; REGNIER; OLIVIER, 2015; RODRIGUES et al., 2018; SIENIAWSKA et al., 2013; SUN et al., 2018; VETAS et al., 2017; ZOMORODIAN et al., 2018). EO are complex volatile components, which are naturally synthesized in different plant parts during the secondary metabolism. The efficiency of the essential oil depends on nature of the compound, composition and orientation of its functional groups (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016). With advancement of technology, research about herbal medicines for identification of bioactive plant compounds in medicinal plants, which are responsible for its pharmacologic and biologic activity, has been intensified (CHAN et al., 2016). Their easy extraction, biodegradability and facile degradation within the environment, as well as no persistence in soil and water, low or absence of any toxicity against vertebrates and in addition performance of important protection functions in plants against pests, turn the use of EOs as very beneficial strategy against pathogens. Those properties enable application of EOs in sensitive areas, as schools, restaurants, hospitals and households (BATISH et al., 2008; BROOKER; KLEINING, 2006).

Various studies already were realized utilizing EO of traditional medicinal plants (ALI-SHTAYEH et al., 2018; ARMIJOS et al., 2018; BASAK, 2018; HASHIM et al., 2017). However, many locations with large plant diversity still were not evaluated regarding their biological potential. One of these locations is the biome Brazilian Pampa, which is a part of the great Pampa, covering half of the southern Brazilian state Rio Grande do Sul, Uruguay and provinces in the north and northwest of Argentina. Rio Grande do Sul has an important agricultural and economical potential, which covers more than 60% of the total area of the state (BOLDRINI et al., 2010; IBGE, 2018). This biome possess high diversity and presents variations of leaf growth rates during the year (BEHLING et al., 2009; CARVALHO; BATELLO, 2009). *Campomanesia aurea* is a native species of the Pampa biome, popularly

known as “guabirobinha-do-campo” or “araçá-rasteiro”, and belong to the family Myrtaceae. This plant can be found in grassy areas or nearby bushes in southern Brazil, mainly in Rio Grande do Sul state, Brazil (EMER; SCHAFER; FIOR, 2018). Studies evidenced the biological potential of species belonging to the family Myrtaceae (DA SILVA et al., 2018; NAKAMURA et al., 2010; NERI-NUMA et al., 2013; SERAGLIO et al., 2018), but up to date there are no related results about the species *Campomanesia aurea* evaluating the antimicrobial activity of its EO.

Thus, the objective of this study was to determine the composition, the antibacterial and antibiofilm activity *in vitro* of the essential oil of *Campomanesia aurea* (EOCA) and the activity of the major component of the oil alone, namely the (*E*)-Nerolidol, against pathogenic microorganisms *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis and *Pseudomonas aeruginosa*, known to cause foodborne diseases.

2 Material and Methods

2.1 Plant material and (*E*)-Nerolidol as a standard compound

A species of *Campomanesia aurea* was collected at the biom Pampa, in the city Alegrete, of Rio Grande do Sul state, Brazil. The plant species was identified, and a specimen was archived in the Museum for Natural Sciences (Museu de Ciências Naturais, MCN) of the University of Taquari Valley – Univates, under the exsicta number HVAT 4209. The leaves were collected in October of 2017. After collection, the leaves were washed, dried at room temperature and homogenized. The standard compound (*E*)-Nerolidol was purchased from Sigma Aldrich® (96% purity).

2.2 Extraction and analysis of the essential oil

The essential oil was extracted from the homogenized leaves of *Campomanesia aurea* by the use of a Clevenger apparatus in three hours of hydrodistillation. The oil was removed by gravity and stored in an amber flask. The residual water was removed with sodium sulfate (Na_2SO_4), and the EOCA was stored under refrigeration at -18°C until further use.

For determination of the chemical composition of the EOCA gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was applied. The gas chromatograph Shimadzu[®], model GC2010 plus, coupled to a mass detector Shimadzu[®], model GCMS-QP2110 Ultra, was used with a fused-silica capillary column Rtx[®]-5MS (30m x 0.25mm x 0.25 μm). The carrier gas was helium. The injected sample volume was 1 μL , utilizing the auto injector AOC-5000 Plus, Shimadzu[®]. The analysis was realized with the following conditions: injector temperature: 240°C ; injection mode: split ratio 1:20 with purge of $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; control of gas flow: linear velocity; carrier gas flow: $1.00\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; program: $50^\circ\text{C} - 290^\circ\text{C}$ ($4^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$); interface temperature of the mass spectrometer: 280°C , temperature of the ion source: 260°C . A series of homologous n-alkanes was analyzed for calculation of the linear retention time, using the same chromatographic conditions. The analytes were identified on the basis of comparison with the data obtained from mass spectrometry available at the National Institute of Standards and Technology (NIST) and by comparison of experimental LRI with those available in scientific literature (ADAMS, 2017).

2.3 Microorganisms

The antimicrobial activity of the EOCA was tested against: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The strains were acquired from Osvaldo Cruz

Foundation (Fundação Osvaldo Cruz, Fiocruz).

2.4 Antimicrobial activity assay

2.4.1 Determination of the minimal inhibitory concentration

The minimal inhibitory concentration (MIC) of the EOCA and of (*E*)-Nerolidol in planktonic cells was determined in Mueller-Hinton Broth (MHB) applying the dilution method in microplates, in accordance with the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). The inoculums were spread out onto agar plates of Mueller-Hinton Agar and incubated for 24 hours. Thereafter, the colonies were transferred to saline solution of 0.85%, and the turbidity was adjusted to 0.5 on the McFarland scale, corresponding to $1-2 \times 10^8$ CFU/mL, and diluted in MHB to give a final concentration of 5×10^4 CFU/well. The EOCA and the (*E*)-Nerolidol were diluted in a solution of 1% Tween 80 and the tested concentration ranges in the assay were 0.0049 to 10 mg/mL for EOCA, and 0.0027 to 5.6 mg/mL for (*E*)-Nerolidol. The wells, which only contained MHB alone and MHB with inoculum were considered as sterility and growth controls, respectively. In addition, growth control in 1.0% Tween 80 was performed. The plates were incubated in 37°C for 16 to 20h. The reading of the plates was realized at 625 nm at time zero and after the incubation time (microplate reader Spectramax®, Molecular Devices, USA). The MIC was considered as the lowest concentration of the test compound that inhibited 100% of microbial growth of the tested organisms after the absorbance assessment.

2.4.2 Determination of the minimal bactericide concentration

To determine the Minimal Bactericide Concentration (MBC), 10 µl of each well, where no growth could be recognized, was removed and inoculated in agar plates containing Mueller-

Hinton (MH) agar. After 24 hours of incubation in 37°C, growth of microorganisms in form of bacterial colonies was observed. In the case of positive evaluation (growth), the concentration of the EOCA was considered as bacteriostatic, and the case of negative evaluation (absence of growth), was considered as bactericidal (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

2.5 Determination of the antibiofilm activity

This assay was performed according to the protocol of Trentin et al. (2011), using crystal violet in 96-well microplates. In those microtiterplates, 80 µl of bacterial suspension, 40 µl of EOCA (concentration of 0.4 mg/mL or 4.0 mg/mL each well) or (*E*)-Nerolidol (concentration of 0.224 mg/mL or 2.24 mg/mL each well) and 80 µl of Trypton Soy Broth (TSB) were added. Then the reading of the plates was done at 600 nm (microplate reader Spectramax®, Molecular Devices, EUA) firstly at time zero. After an incubation time of 24h at 37°C, the second reading at 600 nm was realized to evaluate microbial growth. Thereafter, the liquid content of each well was removed, and the wells were washed for three times with sterile saline solution. To fix the remaining biofilm, the microplates were incubated for 1 hour in an incubator at 60°C. The layer of the formed, adherent biofilm was stained for 15 min at room temperature using a solution of 0.4% crystal violet. Subsequently, the dye was discarded, and the plates were washed with water. The remaining dye, attached to the cells, was solubilized with absolute ethanol 96% for 30 min and the absorbance was measured at 570 nm. The positive control of biofilm formation was considered as 100% biofilm formation. Values above 100% represent a stimulation of biofilm formation in comparison to the control.

2.6 Statistical analysis

The whole analysis was realized in triplicate and in three different experiments. The results

are shown as mean values \pm standard deviation of the obtained data in each experiment. Furthermore, it was realized the Student t test utilizing the software BioEstat5.0[®].

3 Results and Discussion

Table 1 presents the composition of EOCA, where a total of 23 components could be identified. The major components were the sesquiterpenes (*E*)-Nerolidol (56.04%) and α -Cadinol (3.46%), monoterpenes α -Pinene and β -Pinene (4.16% and 3.39%, respectively), Linalool (5.98%) and Terpinolene (4.41%), amongst others.

According to the results presented in Table 1, the principal component of the EOCA was (*E*)-Nerolidol, which is a sesquiterpene alcohol, naturally occurring in EO of various plants, possessing floral aroma (FERREIRA et al., 2012; MCGINTY; LETIZIA; API, 2008). Frequently incorporated to cosmetics (as shampoos or perfumes) and non-cosmetic products (as detergents and cleaning products) (MCGINTY; LETIZIA; API, 2008), Nerolidol is also widely used in the food industry as flavor enhancer since it was approved as to be safe by the Food and Drug Administration (FDA) of the USA. Furthermore, with the knowledge about the performed bioactivity of Nerolidol in the defense system of plants, researchers have explored various aspects about its activity in detail tem (CHAN et al., 2016).

Table 1: Chemical composition of the essential oil of *Campomanesia aurea* (EOCA).

	Component	KI _{exp} ^a	KI _{lit} ^b	Percentage of EO
1	α -Thujene	926	930	1.43
2	α -Pinene	933	939	4.16
3	β -Pinene	978	979	3.39
4	Myrcene	991	990	0.55
5	α -Phellandrene	1006	1002	0.87

6	α -Terpinene	1017	1017	0.68
7	Limonene	1029	1029	1.04
8	(1,8)-Cineole	1032	1031	2.61
9	(<i>E</i>)- β -Ocimene	1047	1044	0.61
10	γ -Terpinene	1058	1059	2.73
11	Terpinolene	1090	1088	4.41
12	Linalool	1101	1096	5.98
13	Terpinen-4-ol	1179	1177	0.84
14	α -Terpineol	1192	1188	3.16
15	Geranyl acetate	1385	1381	0.38
16	(<i>E</i>)-Caryophyllene	1421	1419	0.62
17	(4,5-di-epi) Aristolochene	1463	1473	0.55
18	Bicyclogremacrene	1499	1500	1.67
19	α -Muurolene	1503	1500	0.29
20	Cadinene	1526	1523	243
21	(<i>E</i>)-Nerolidol	1568	1563	56.04
22	epi- α -Muurolol	1646	1642	2.10
23	α -Cadinol	1659	1654	3.46

^a Experimental Kovats retention index.

^b Literature Kovats retention index.

Regarding the percentage of Nerolidol obtained in EO of the leaves of different plant species, *Piper clausenianum* showed the highest percentage of (*E*)-Nerolidol (81.4%), followed by *Zanthoxylum hyemale* (51%), *Zornia brasiliensis* (48%) and *Swinglea glutinosa* (28.4%) (CHAN et al., 2016). In this way, it is possible to emphasize the percentage of (*E*)-Nerolidol in EOCA, which turns the studied species being a promising source for bioprospection of this

compound.

It should be noted that some factors may alter the composition of EO, including the concentration of Nerolidol, such as the change of seasons during the year, soil composition, amongst others (Chan et al, 2016). This was verified by Marques e Kaplan (2010), observed a variation in Nerolidol production in leaves of *Piper claussonianum* in Brazil, being the highest in spring (94% in October) compared to autumn (80% in May). Simionatto et al., (2005) observed, that in the essential oil of *Zanthoxylum hyemale*, collected in Rio Grande do Sul state (Southern Brazil) the (*E*)–Nerolidol was only present in young leaves (51.5%), in fruits (1.44%) and in flowers (0.28%), whereas it could not be encountered in mature leaves. These results can be useful to identify and determine the most appropriate period of the year for production of the essential oil with an elevated content of the certain compound. It is worth highlighting, that for the presence study, the leaves of *Campomanesia aurea* were collected and the EO was produced in October, when it is springtime in southern Brazil.

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was used as a measure for the antibacterial activity of the EOCA and of (*E*)–Nerolidol against strains of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Enteritidis* and *P. aeruginosa*. The results for the MIC are shown in Table 2.

Table 2: Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the EOCA and (*E*)-Nerolidol against *L. monocytogenes* ATCC 19114, *S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, (n=3).

Bacteria	Concentration (mg/mL)			
	EOCA		(<i>E</i>)-Nerolidol	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	5.0	>10	0.7	>10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATC 25923	1.25	5.0	0.175	0.7
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	>10	>10	>5.6	>5.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>10	>10	>5.6	>5.6

In accordance with Table 2, an antibacterial effect could be observed against *L. monocytogenes* and *S. aureus* applying the EOCA and the standard substance (*E*)-Nerolidol. No antibacterial activity within this concentration range could be evidenced against *S. Enteritidis* and *P. aeruginosa*.

Some studies addressed the pharmacologic and biologic activities of Nerolidol, which include antioxidant (VINHOLES et al., 2014a, 2014b), antimicrobial (HADA et al., 2003; INOUE et al., 2004; TOGASHI et al., 2010) and antibiofilm activity (LEE et al., 2014), beside others. The antibacterial effect of terpene alcohols against *S. aureus*, amongst them Nerolidol, were investigated by Inoue et al (2004), evaluating the antibacterial activity in terms of bacterial K⁺ ions leakage, and thus suggesting, that terpene alcohols can cause cell damages, as an effect depending on concentration and type of terpene alcohol. The inability of the EOCA and of (*E*)-Nerolidol to act against the Gram-negative bacterial strains of *S. Enteritidis* and *P. aeruginosa* may be related to the structure of their cell wall. Only a few published works in

literature are related to the presence of Nerolidol in essential oils and its antimicrobial activity, and in specific for pure Nerolidol as a standard compound, as (*E*)-Nerolidol, as well as its racemic mixtures of (*Z*)-Nerolidol and (*E*)-Nerolidol. Skaltsa et al., (2000) evaluated the composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria albida* spp. *albida*, where (*E*)-Nerolidol with 9.03% was the second principal component beyond the main component Linalool with 52.63%. In antimicrobial activity assays against *S. aureus* ATCC 25923 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, other authors obtained the same growth inhibition against *S. aureus*, both for the essential oil, as well as for (*E*)-Nerolidol. Against *P. aeruginosa* an antimicrobial effect could be observed when the essential oil was used, but not with the standard compound (*E*)-Nerolidol. In our studies, antimicrobial effect could not be observed when the EOCA and (*E*)-Nerolidol was used. In a study evaluating the EO of seeds from *Momordica charantia*, Braca et al., (2008) encountered (*E*)-Nerolidol as the principal compound with 61.6%, and associated its antimicrobial activity to some extent against *S. aureus* ATCC 6538 and clinical isolates of *S. aureus*. Brehm-stecher and Johnson (2003) demonstrated the sensibility of *S. aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics for sesquiterpenes, amongst them nerolidol, increasing the susceptibility of microorganisms. The authors observed, that sesquiterpenes promoted an intracellular accumulation of DNA impermeabilizing the cytoplasmatic membrane of *Lactobacillus fermentum*, suggesting, that the increased permeability resulted by rupture of the cytoplasmatic membrane. Simões et al. (2008) observed an increased antimicrobial activity against *S. aureus* in disk diffusion tests, when a racemic mixture of (*Z*)/(*E*)-Nerolidol was added, and decrease of the MIC values, when applied as adjunct compound beside the antibiotics ciprofloxacin, erythromycin and gentamycine against *Escherichia coli*. Thus, in this work, the (*E*)-Nerolidol as the main compound, present in EOCA can be associated as the main bactericidal agent against the

tested microorganisms.

The percentage of inhibition of biofilm formation is shown in Table 3. In accordance with the presented results in Table 3, an antibiofilm effect could be observed for *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. Enteritidis*, and no efficiency against *P. aeruginosa*. The most satisfactory results for inhibition of biofilm formation could be obtained against *L. monocytogenes* with concentrations of 4 mg/mL ($95\% \pm 2.0$) and 2.24 mg/mL (90.4 ± 7.7) for EOCA and (*E*)-Nerolidol, respectively. It could be observed, that the inhibition results obtained for EOCA compared to those of the standard compound (*E*)-Nerolidol, are similar ($P \leq 0.05$). In this way, it can be assumed, that the principal component (*E*)-Nerolidol present in the EOCA, may be responsible as the principal agent for inhibition of biofilm formation for the three tested microorganisms, as there was a correlation between inhibition and concentration applied in the assay. For *S. Enteritidis*, even when no value resulted for the MIC assay at the tested concentrations, it could be obtained an inhibition of the biofilm formation for EOCA (88.2 ± 2.7), as well as the (*E*)-Nerolidol (86.9 ± 2.1).

Table 3: Inhibition of biofilm formation (%) of EOCA and (*E*)-Nerolidol against *L. monocytogenes* ATCC 19114, *S. aureus* ATCC 25923, *S. Enteritidis* ATCC 13076 and *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Bacteria	Inhibition (%)			
	EOCA		(<i>E</i>)-Nerolidol	
	0.4 mg/mL	4.0 mg/mL	0.224 g/mL	2.24 mg/mL
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	61.6 ± 3.9 ^b	95.0 ± 2.0 ^a	68.1 ± 2.3 ^b	90.4 ± 7.7 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	72.9 ± 6.2 ^{bc}	90.4 ± 2.6 ^a	70.5 ± 3.5 ^c	83.8 ± 4.4 ^{ab}
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	71.2 ± 2.4 ^c	88.2 ± 2.7 ^a	78.2 ± 2.5 ^b	86.9 ± 2.1 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0

^{a-c} Means with identical superscripts in each line exhibit no differences at the 95%

significance level ($p \leq 0.05$).

Lee et al. (2014) realized assays using EO with a known concentration of Nerolidol to evaluate the inhibition of biofilm formation of *S. aureus*, beside additional evaluation of the Nerolidol isomers in separate, and obtained inhibition of 45%, when utilizing (*E*)-Nerolidol at a concentration of 0.01% (v/v). Prevention of biofilm formation is a promising approach, since, when matured, the biofilms possess a strong resistance against cleaning processes and disinfectants (KARATAN; WATNICK, 2009).

4. Conclusion

For the first time it could be shown, that the essential oil of *Campomanesia aurea* has an efficient antimicrobial activity against *L. monocytogenes* and *S. aureus*, and moreover has the capacity to act as an inhibitor of biofilm formation against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. Enteritidis*. The effect of the encountered main compound in the EOCA (*E*)-Nerolidol, also was investigated. The antimicrobial and antibiofilm activity of the EO of *Campomanesia*

aurea can be associated at least to some extent, to the presence of (*E*)-Nerolidol in its composition. Thus, it is worth highlighting that the high percentage of (*E*)-Nerolidol within the EOCA, turns the studied plant species being a promising source for bioprospection of this compound.

Acknowledgements

This study was partly financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Conflict of Interest

No conflict of interest declared

References

- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4.1 ed., 2017.
- AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 001–007, 2014.
- ALI-SHTAYEH, M. S. et al. Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Clinopodium serpyllifolium* (M. Bieb.) Kuntze growing in Palestine. **Industrial Crops and Products**, v. 124, n. May, p. 617–625, 2018.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.
- ARMIJOS, C. et al. Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Clinopodium serpyllifolium* (M.Bieb.) Kuntze growing in Palestine. **Industrial Crops and Products**, v. 225, n. April, p. 319–326, 2018.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating

antimicrobial activity : A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BASAK, S. Modelling the effect of betel leaf essential oil on germination time of *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* spore population. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, n. April, p. 361–366, 2018.

BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 2166–2174, 2008.

BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. September, p. 721–726, 2007.

BEHLING, H. et al. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio. In: PILLAR, V. D. P. et al. (Eds.). . **CAMPUS SULINOS conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 13–25, 2009.

BOLDRINI, I. L. et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre: Pallotti, 2010.

BOLDRINI, I. LOB; OVERBECK, G.; TREVISAN, R. Biodiversidade de Plantas. In: PILLAR, V. D. P.; LANGE, O. (Eds.). **Os Campos do Sul**. Porto Alegre: . p. 192. , 2015.

BRACA, A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. v. 79, p. 123–125, 2008.

BRACKMAN, G. et al. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 144–151, 2009.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol , Farnesol , Bisabolol , and Apitone. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 10, p. 3357–3360, 2003.

BRIDIER, A. et al. Bio fi lm-associated persistence of food-borne pathogens. v. 45, p. 167–178, 2015.

BROOKER, M. I. H.; KLEINING, D. A. **Field Guide to Eucalyptus**. 3rd. ed. Melbourne: Melbourne : Bloomings Books, 2006.

BURT, S. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a

review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CARVALHO, P. C. D F.; BATELLO, C. Access to land, livestock production and ecosystem conservation in the Brazilian Campos biome: The natural grasslands dilemma. **Livestock Science**, v. 120, n. 1–2, p. 158–162, 2009.

CHAN, W. K. et al. Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. **Molecules**. v. 21, n. 529, p. 1-40, 2016.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. 2012.

COSTERTON, J. W. et al. NATURE AND DISEASE. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 435–464, 1987.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86–95, 1978.

COUTINHO, N. M. et al. Cold plasma processing of milk and dairy products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 74, n. October 2017, p. 56–68, 2018.

DA SILVA GÜNDEL, S. et al. Nanoemulsions containing Cymbopogon flexuosus essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, n. March, p. 268–276, 2018.

DA SILVA, V. P. et al. Chemical composition and in vitro leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. **Industrial Crops and Products**, v. 123, n. March, p. 638–645, 2018.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, p. 1–16, 2016.

DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

DUSCHATZKY, C. B. et al. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 16, n. 4, p. 247–251, 2005.

- EMER, A. A.; SCHAFER, G.; FIOR, C. S. Cutting from *campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae): The collection time of propagules and the effects of auxin. **Revista Brasileira de Ciencias Agrarias**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2018.
- ESTEVES, T. et al. Land Use Policy Agricultural land use change in the Brazilian Pampa Biome : The reduction of natural grasslands. v. 63, p. 394–400, 2017.
- FARAG, N. F. et al. Characterization of essential oils from Myrtaceae species using ATR-IR vibrational spectroscopy coupled to chemometrics. **Industrial Crops & Products**, v. 124, n. February, p. 870–877, 2018.
- FARISA BANU, S. et al. Effects of patchouli and cinnamon essential oils on biofilm and hyphae formation by *Candida* species. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, p. 332–339, 2018.
- FERREIRA, F. M. et al. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 2, p. 189–196, 2012.
- FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic Resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–484, 2017.
- FUKUZAKI, S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Biocontrol science**, v. 11, n. 4, p. 147–57, 2006.
- GALANIS, E. et al. Web-based Surveillance and Global Salmonella Distribution , 2000 – 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 381–388, 2006.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.
- GOVAERTS, R. et al. **World checklist of Myrtaceae**. Richmond: Royal Botanic Gardens, 2008.
- HADA, T. et al. Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Natural medicines**, v. 57, n. 2, p. 64–67, 2003.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J Appl Microbiol**, v. 86, p. 985–990, 1999.
- HASHIM, G. M. et al. Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. p. 1458–1464, 2017.

HAVELAAR, A. H. et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1–23, 2015.

HEIR, E. et al. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 275, n. January, p. 46–55, 2018.

HUANG, S. et al. Antimicrobial coatings for controlling *Listeria monocytogenes* based on polylactide modified with titanium dioxide and illuminated with UV-A. **Food Control**, v. 73, p. 421–425, 2017.

IBARRA-SÁNCHEZ, L. A.; VAN TASSELL, M. L.; MILLER, M. J. Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. **Food Microbiology**, v. 72, p. 128–134, 2018.

IBGE. **Instituto brasileiro de geografia e estatística. Mapa dos biomas brasileiros**. 2018.

INOUE, Y. et al. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 2, p. 325–331, 2004.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.

KAUFFMANN, C. et al. Chemical Composition and Evaluation Preliminary of Antileishmanial Activity in vitro of Essential Oil from Leaves of *Eugenia pitanga*, a Native Species of Southern of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, p. 559–569, 2017.

KUMAR, A. et al. Biofilms : Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. September, p. 481–489, 2017.

LANDRUM, L. R. The Development of the Fruits and Seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae). **Brittinia**, v. 34, n. 2, p. 220–224, 1982.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p. 13–39, 2012.

LEE, K. et al. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**

and Biotechnology, v. 98, n. 22, p. 9447–9457, 2014.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel : Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. v. 49, p. 596–603, 2012.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 7, 2010.

LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das famílias de Angiospermas da Flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005.

MALTA, G. L. et al. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, v. 49, p. 604–611, 2012.

MANGANYI, M. C.; REGNIER, T.; OLIVIER, E. I. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. **South African Journal of Botany**, v. 99, p. 115–121, 2015.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. SUPPL. 3, p. S247–S250, 2008.

MEIRELES, A.; GIAOURIS, E.; SIMÕES, M. Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. **Food Research International**, v. 82, p. 71–85, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: <<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surto-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

NAKAMURA, M. J. et al. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 6, p. 1170–1175, 2010.

- NEIDELL, M. J. et al. Costs of healthcare-and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 807–815, 2012.
- NELLURI, K. D. D.; THOTA, N. S. Diseases. In: **Food Safety and Preservation**. [s.l.] Elsevier Inc. p. 231–268, 2018.
- NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70–76, 2013.
- NEVES, P. R. et al. **PSEUDOMONAS | Pseudomonas aeruginosa**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier. v. 3, 2014.
- NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 3–15, 2010.
- OVERBECK, G. E. et al. Fisionomia dos Campos. In: PILLAR, V. D. P.; LANGE, O. (Eds.). **. Os Campos do Sul**. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS. p. 192. 2015
- POZO, J. L.; PATEL, R. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, n. 2, p. 204–209, 2007.
- REY, A. M.; SILVESTRE, A. A. **Comer sem riscos 2: as doenças transmitidas por alimentos**. São Paulo: Varela, 2009.
- REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883–890, 2008.
- RODRIGUES, J. B. DOS S. et al. Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, n. March, p. 293–299, 2018.
- SAVIUC, C.-M. et al. Essential Oils with Microbicidal and Antibiofilm Activity. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 137–151, 2015.
- SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.
- SERAGLIO, S. K. T. et al. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during

ripening. **Food Chemistry**, v. 239, p. 649–656, 2018.

SEVENTER, J. M. VAN; HAMER, D. H. Foodborne Diseases. **International Encyclopedia of Public Health**, v. 3, p. 160–173, 2017.

SHARIF, M. K.; JAVED, K.; NASIR, A. Foodborne Illness: Threats and Control. **Foodborne Diseases**, v. 15, p. 501–523, 2018.

SIENIAWSKA, E. et al. Antimicrobial efficacy of *Mutellina purpurea* essential oil and α -pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilm cultures. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 152–157, 2013.

SILVA, C. J. et al. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 104–108, 2010.

SIMIONATTO, E. et al. Essential Oil from *Zanthoxylum hyemale*. v. 71, p. 759–763, 2005.

SIMÕES, M. et al. Enhancement of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Antibiotic Susceptibility Using Sesquiterpenoids. p. 616–623, 2008.

SKALTSA, H. D. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Scutellaria albida* ssp. *albida* from Greece. v. 66, p. 672–674, 2000.

STEENACKERS, H. et al. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. v. 45, p. 502–531, 2012.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 187–209, 2002.

SUN, Y. et al. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 87, n. July 2017, p. 235–241, 2018.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. v. 2016, 2016.

TOGASHI, N. et al. Antibacterial Activities Against *Staphylococcus aureus* of Terpene Alcohols With Aliphatic Carbon Chains. v. 22, n. May 2013, p. 263–269, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed. 2000.

- TRENTIN, D. D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.
- TRENTIN, D. DA S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113–238, 2013.
- VETAS, D. et al. Disinfection efficiencies of sage and spearmint essential oils against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus* cells in comparison with sodium hypochlorite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, n. June, p. 19–25, 2017.
- VINHOLES, J. et al. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. **Food Chemistry**, v. 156, p. 204–211, 2014a.
- VINHOLES, J. et al. Hepatoprotection of sesquiterpenoids: A quantitative structure-activity relationship (QSAR) approach. **Food Chemistry**, v. 146, p. 78–84, 2014b.
- XIONG, Y.; LIU, Y. Biological control of microbial attachment: A promising alternative for mitigating membrane biofouling. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 825–837, 2010.
- ZHANG, P. et al. Imaging the Microprocesses in Biofilm Matrices. **Trends in Biotechnology**, p. 1–13, 2018.
- ZOMORODIAN, K. et al. The composition, antibiofilm and antimicrobial activities of essential oil of *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. March, p. 300–304, 2018.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi analisado o óleo essencial obtido das folhas da espécie *Campomaneisa aurea*, pertencente à família Myrtaceae, planta nativa do Rio Grande do Sul. Até o momento, a espécie estudada era referida como de potencial ornamental, e seu potencial antimicrobiano não havia sido relatado.

A análise de composição química do óleo essencial possibilitou identificar a presença de 23 componentes, sendo os majoritários os sesquiterpenos (*E*)-Nerolidol e α -Cadinol, e os monoterpenos α -Pineno e β -Pineno, Linalol e Terpinoleno.

Em relação à atividade inibidora de formação de biofilme, foi possível observar uma ação contra as bactérias Gram positivas *L. monocytogenes* e *S. aureus*, e Gram negativa *S. Enteritidis*, tanto para o óleo essencial quanto para o padrão de (*E*)-Nerolidol, componente majoritário do óleo essencial. Esse resultado pode indicar que a ação antimicrobiana do óleo essencial é, pelo menos em parte, associada ao seu componente majoritário. Quanto aos valores de MIC apresentados, pode-se observar uma ação contra as bactérias Gram positivas *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Os resultados apresentados indicam o potencial antibacteriano do óleo essencial obtido das folhas de *Campomanesia aurea*, além de demonstrar um alto percentual de (*E*)-Nerolidol em sua composição (56,0%). Trabalhos futuros podem ser desenvolvidos visando à pesquisa para identificar fatores que contribuam para a presença deste alto percentual de (*E*)-Nerolidol em *Campomanesia aurea*, bem como a atividade do OECA e do (*E*)-Nerolidol em biofilmes já formados, indicando um possível uso na desinfecção de superfícies.

Deste modo, conclui-se que a bioprospecção de novas espécies, principalmente em

loais com uma ampla biodiversidade, como o bioma Pampa, pode ser uma importante fonte de novas alternativas de aplicação tecnológica para o combate contra patógenos, ressaltando a importância do estudo para proteção do bioma Pampa, por sua riqueza não explorada e potencial de uso.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry**. Allured Publishing Corporation, Illinois, ed. 4.1, 809 p.2017.

AKTHAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms : A review. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 001–007, 2014.

ALEJANDRA, V.; DOMINGUEZ, G. G.; MARLANA, H. B. Fatores de virulência de *Listeria monocytogenes* e sua regulação. **Revista Chilena Infectologia**, v. 30, n. 4, p. 407-416, 2013.

ALI-SHTAYEH, M. S. et al. Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Clinopodium serpyllifolium* (M. Bieb.) Kuntze growing in Palestine. **Industrial Crops and Products**, v. 124, n. May, p. 617–625, 2018.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008.

ARMIJOS, C. et al. Chemical profile and bioactive properties of the essential oil isolated from *Clinopodium serpyllifolium* (M.Bieb.) Kuntze growing in Palestine. **Industrial Crops and Products**, v. 225, n. April, p. 319–326, 2018.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating

antimicrobial activity : A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARTH, A. L.; PITT, T. L. Microbial pathogens associated with cystic fibrosis: special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz J Infect Dis**, v. 2, p. 43-61, 1998.

BASAK, S. Modelling the effect of betel leaf essential oil on germination time of *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* spore population. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, n. April, p. 361–366, 2018.

BATISH, D. R. et al. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**, v. 256, p. 2166–2174, 2008.

BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. September, p. 721–726, 2007.

BEHLING, H. et al. Dinâmica dos campos no sul do Brasil durante o Quaternário Tardio. In: PILLAR, V. D. P. et al. (Eds.). . **CAMPUS SULINOS conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. p. 13–25, 2009.

BOLDRINI, I. L. et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre: Pallotti, 2010.

BOLDRINI, I. LOB; OVERBECK, G.; TREVISAN, R. Biodiversidade de Plantas. In: PILLAR, V. D. P.; LANGE, O. (Eds.). . **Os Campos do Sul**. Gráfica da UFRGS: Porto Alegre,. p. 192, 2015.

BRACA, A. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. v. 79, p. 123–125, 2008.

BRACKMAN, G. et al. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. **Research in Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 144–151, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.p

df> (Acessado em 06 mar 2018).

BRASIL, Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em:

<<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol , Farnesol , Bisabolol , and Apritone. v. 47, n. 10, p. 3357–3360, 2003.

BRIDIER, A. et al. Bio film-associated persistence of food-borne pathogens. v. 45, p. 167–178, 2015.

BROOKER, M. I. H.; KLEINING, D. A. **Field Guide to Eucalyptus**. 3rd. ed. Melbourne: Melbourne : Bloomings Books, 2006.

BURT, S. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CARVALHO, P. C. D F.; BATELLO, C. Access to land, livestock production and ecosystem conservation in the Brazilian Campos biome: The natural grasslands dilemma. **Livestock Science**, v. 120, n. 1–2, p. 158–162, 2009.

CHAN, W. K. et al. Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. **Molecules**. v. 21, n. 529, p. 1-40, 2016.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 58, 2017.

CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. 2012.

COSTERTON, J. W. et al. NATURE AND DISEASE. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 41, p. 435–464, 1987.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86–95, 1978.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GRENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infectious. **Science**, v. 284, p 1318-1322, 1999.

COUTINHO, N. M. et al. Cold plasma processing of milk and dairy products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 74, n. October 2017, p. 56–68, 2018.

CZAIKOSKI, K. et al. Extraction of *Campomanesia xanthocarpa* fruit using supercritical CO₂ and bioactivity assessments. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 98, p. 79-85, 2015.

DA SILVA GÜNDEL, S. et al. Nanoemulsions containing *Cymbopogon flexuosus* essential oil: Development, characterization, stability study and evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, n. March, p. 268–276, 2018.

DA SILVA, V. P. et al. Chemical composition and in vitro leishmanicidal, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado biome. **Industrial Crops and Products**, v. 123, n. March, p. 638–645, 2018.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, p. 1–16, 2016.

DUNNE, W. M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–166, 2002.

DUSCHATZKY, C. B. et al. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 16, n. 4, p. 247–251, 2005.

EMER, A. A.; SCHAFER, G.; FIOR, C. S. Cutting from *campomanesia aurea* O. Berg (Myrtaceae): The collection time of propagules and the effects of auxin. **Revista Brasileira de Ciencias Agrarias**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2018.

ESTEVEZ, T. et al. Land Use Policy Agricultural land use change in the Brazilian Pampa Biome: The reduction of natural grasslands. v. 63, p. 394–400, 2017.

FARAG, N. F. et al. Characterization of essential oils from Myrtaceae species using ATR-IR vibrational spectroscopy coupled to chemometrics. **Industrial Crops & Products**, v. 124, n. February, p. 870–877, 2018.

FARISA BANU, S. et al. Effects of patchouli and cinnamon essential oils on biofilm and hyphae formation by *Candida* species. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, p. 332–339, 2018.

FERREIRA, F. M. et al. Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics.

Toxicology in Vitro, v. 26, n. 2, p. 189–196, 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 2. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu; 1996.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic Resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369–484, 2017.

FUKUZAKI, S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Biocontrol science**, v. 11, n. 4, p. 147–57, 2006.

GALANIS, E. et al. Web-based Surveillance and Global Salmonella Distribution , 2000 – 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 381–388, 2006.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4. ed. Barueri, SP: Manole, 2011.

GOVAERTS, R. et al. **World checklist of Myrtaceae**. Richmond: Royal Botanic Gardens, 2008.

HADA, T. et al. Inhibitory effects of terpenes on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Natural medicines**, v. 57, n. 2, p. 64–67, 2003.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J Appl Microbiol**, v. 86, p. 985–990, 1999.

HASHIM, G. M. et al. Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. p. 1458–1464, 2017.

HAVELAAR, A. H. et al. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. **PLoS ONE**, v. 12, p. 1–23, 2015.

HEIR, E. et al. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 275, n. January, p. 46–55, 2018.

HOSSAIN, Z.; Bacteria: *Pseudomonas*. **Encyclopedia of Food Safety**. v. 1, p. 490-500, 2014.

HUANG, S. et al. Antimicrobial coatings for controlling *Listeria monocytogenes* based on polylactide modified with titanium dioxide and illuminated with UV-A. **Food Control**, v. 73, p. 421–425, 2017.

IBARRA-SÁNCHEZ, L. A.; VAN TASSELL, M. L.; MILLER, M. J. Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. **Food Microbiology**, v. 72, p. 128–134, 2018.

INOUE, Y. et al. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 2, p. 325–331, 2004.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre, Artmed, 2005.

KÄFERSTEIN, F.K.; MOTARJEMI, Y.; BETTCHER, D. W.; Foodborne Disease Control: A Transnational Challenge. **Emerging Infectious Diseases**. v.3, n. 4, p. 503-510, 1997.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.

KAUFFMANN, C. et al. Chemical Composition and Evaluation Preliminary of Antileishmanial Activity in vitro of Essential Oil from Leaves of *Eugenia pitanga*, a Native Species of Southern of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, p. 559–569, 2017.

KNOWLES, M. R.; GILLIGAN, P. H.; BOUCHER, R. C. Cystic fibrosis. In: MANDELL, D.; BENETHS, J; DOLIN, R. (eds) **Principles and practice of infectious diseases**. Churchill, 1995.

KUMARASWAMY, M.; DO, C.; SAKOULAS, G.;NONEJUIE, P.;TSENG, G. W.; KING, H.; FIERER, J.; POGLIANO, J.; NIZET, V.; *Listeria monocytogenes* endocarditis: case report, review of the literature, and laboratory evaluation of potential novel antibiotic synergies. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 51, p. 468-478, 2018.

KUMAR, A. et al. Bio fi lms : Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. September, p. 481–489, 2017.

LANDRUM, L. R. The Development of the Fruits and Seeds of *Campomanesia* (Myrtaceae).

Brittinia, v. 34, n. 2, p. 220–224, 1982.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p. 13–39, 2012.

LARRAIN, D.C; CARVAJAL, J. Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados em el traspaso de *Listeria monocytogenes* através de la barrera placentária (uma revisão bibliográfica). **Boletín Escuela de Medicina** – Pontificia Universidad Católica de Chile, v. 33, n. 1, 2008.

LEE, K. et al. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 22, p. 9447–9457, 2014.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel : Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. v. 49, p. 596–603, 2012.

LÖFSTRÖM, C.; HANSEN, T.; MAURISCHAT, S.; MALORNY, B.; *Salmonella*: Salmonellosis. **Encyclopedia of Food and Health**. p. 701-705, 2016.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 7, 2010.

LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das famílias de Angiospermas da Flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v.2:1051-1060, 2000.

MALTA, G. L. et al. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research**

International, v. 49, p. 604–611, 2012.

MANGANYI, M. C.; REGNIER, T.; OLIVIER, E. I. Antimicrobial activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* isolates and their biofilms. **South African Journal of Botany**, v. 99, p. 115–121, 2015.

MANTILLA, S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p.180-192, 2007.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Addendum to Fragrance material review on Nerolidol (isomer unspecified). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. SUPPL. 3, p. S247–S250, 2008.

MEIRELES, A.; GIAOURIS, E.; SIMÕES, M. Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. **Food Research International**, v. 82, p. 71–85, 2016.

MOURA-COSTA, G. F. et al. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on na indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, p. 631-638, 2012.

MURRAY, P.R. Laboratory Procedures for Epidemiologic Analysis. In: **Manual of Clinical Microbiology** 6th ed., 1995.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NAKAMURA, M. J. et al. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 6, p. 1170–1175, 2010.

NEIDELL, M. J. et al. Costs of healthcare-and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 6, p. 807–815, 2012.

NELLURI, K. D. D.; THOTA, N. S. Diseases. In: **Food Safety and Preservation**. [s.l.] Elsevier Inc. p. 231–268, 2018.

NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70–76, 2013.

NEVES, P. R. et al. **PSEUDOMONAS | Pseudomonas aeruginosa**. Second Edi ed. [s.l.]

Elsevier. v. 3, 2014.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 3–15, 2010.

OVERBECK, G. E. et al. Fisionomia dos Campos. In: PILLAR, V. D. P.; LANGE, O. (Eds.). **Os Campos do Sul**. Gráfica da UFRGS: Porto Alegre. p. 192, 2015.

PALLERONI, N. J. Introduction to the aerobic pseudomonads. In: Collier, L; Balows, A.; Sussman, M. (eds). **Topley & Wilson's microbiology and microbial infections – Systematic bacteriology**. v. 2 , p. 1091-1108, 1998.

PASSOS, M. H. C. R.; KUAYE, A. Y. Relato de surtos de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus* importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, n. 1, p. 71-6, 1996.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.). **Principles and practice of infections diseases**, 1995.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell D. Benneths J e Dolin R. **Principles and Praticce of Infectious Diseases**. Churchill Livingstone, New York;2310, 2000.

POZO, J. L.; PATEL, R. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, n. 2, p. 204–209, 2007.

SANTOS, A. L. D. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, dez; v. 43, n. 6, p. 413 – 423, 2007.

REY, A. M.; SILVESTRE, A. A. **Comer sem riscos 2: as doenças transmitidas por alimentos**. São Paulo: Varela, 2009.

REYNERTSON, K. A. et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883–890, 2008.

RODRIGUES, J. B. DOS S. et al. Efficacy of using oregano essential oil and carvacrol to remove young and mature *Staphylococcus aureus* biofilms on food-contact surfaces of stainless steel. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, n. March, p. 293–299, 2018.

SÁ, S. et al. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*.

Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 28, p. 303-311, 2018.

SAVIUC, C.-M. et al. Essential Oils with Microbicidal and Antibiofilm Activity. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 137–151, 2015.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SERAGLIO, S. K. T. et al. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. **Food Chemistry**, v. 239, p. 649–656, 2018.

SEVENTER, J. M. VAN; HAMER, D. H. Foodborne Diseases. **International Encyclopedia of Public Health**, v. 3, p. 160–173, 2017.

SHARIF, M. K.; JAVED, K.; NASIR, A. Foodborne Illness: Threats and Control. **Foodborne Diseases**, v. 15, p. 501–523, 2018.

SIENIAWSKA, E. et al. Antimicrobial efficacy of *Mutellina purpurea* essential oil and α -pinene against *Staphylococcus epidermidis* grown in planktonic and biofilm cultures. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 152–157, 2013.

SIMIONATTO, E. et al. Essential Oil from *Zanthoxylum hyemale*. v. 71, p. 759–763, 2005.

SIMÕES, M. et al. Enhancement of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Antibiotic Susceptibility Using Sesquiterpenoids. p. 616–623, 2008.

SKALTSA, H. D. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Scutellaria albida* ssp . *albida* from Greece. v. 66, p. 672–674, 2000.

STEENACKERS, H. et al. *Salmonella* biofilms : An overview on occurrence , structure, regulation and eradication. v. 45, p. 502–531, 2012.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differntiated communities. **Annu Rev Microbiol**, v. 56, p. 187–209, 2002.

SUN, Y. et al. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of lemon essential oil on the acid tolerance and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **Archives of Oral Biology**, v. 87, n. July 2017, p. 235–241, 2018.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. v. 2016, 2016.

- TOGASHI, N. et al. Antibacterial Activities Against *Staphylococcus aureus* of Terpene Alcohols With Aliphatic Carbon Chains. v. 22, n. May 2013, p. 263–269, 2010.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre, 2000.
- TRENTIN, D. D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.
- TRENTIN, D. DA S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113–238, 2013.
- VETAS, D. et al. Disinfection efficiencies of sage and spearmint essential oils against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus* cells in comparison with sodium hypochlorite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, n. June, p. 19–25, 2017.
- VINHOLES, J. et al. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models. **Food Chemistry**, v. 156, p. 204–211, 2014a.
- VINHOLES, J. et al. Hepatoprotection of sesquiterpenoids: A quantitative structure-activity relationship (QSAR) approach. **Food Chemistry**, v. 146, p. 78–84, 2014b.
- XIONG, Y.; LIU, Y. Biological control of microbial attachment: A promising alternative for mitigating membrane biofouling. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 3, p. 825–837, 2010.
- ZHANG, P. et al. Imaging the Microprocesses in Biofilm Matrices. **Trends in Biotechnology**, p. 1–13, 2018.
- ZOMORODIAN, K. et al. The composition, antibiofilm and antimicrobial activities of essential oil of *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. March, p. 300–304, 2018.
- WILLIAMS, M. D.; WILKINS, S. T. B. **Manual of Determinative Bacteriology**. 9th ed., Baltimore; 1994.